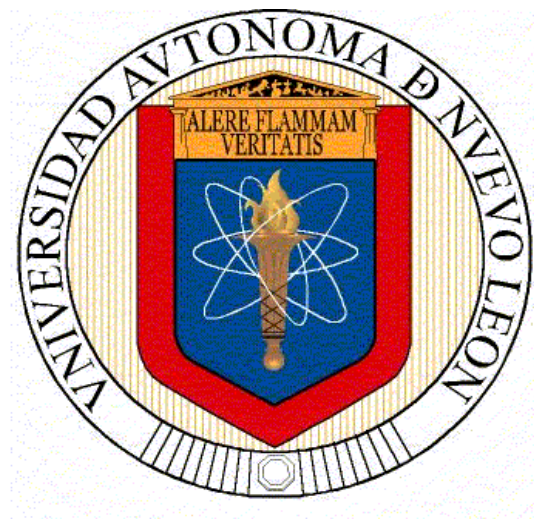


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



TESIS

**EL OZONO ACELERA LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS Y
DISMINUYE LA PRODUCCIÓN DE LAS CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS Y QUIMOCINAS IL-1 β , TNF- α , RANTES Y
CCL-3.**

POR

LUCÍA ISABEL GÓMEZ BUTZMANN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
PERIODONCIA CON IMPLANTOLOGÍA ORAL**

OCTUBRE 2014

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Periodoncia e Implantología Oral

**EL OZONO ACELERA LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS Y
DISMINUYE LA PRODUCCIÓN DE LAS CITOCINAS
PROINFLAMATORIAS Y QUIMOCINAS IL-1 β , TNF- α , RANTES Y
CCL-3.**

Comité de Tesis

Juan Manuel Solís Soto
Director de Tesis

Secretario

Vocal

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Manuel Solís Soto, por fomentar la investigación durante el transcurso de mi maestría, por creer en el proyecto y alentar mis inquietudes hacia éste nuevo campo de la medicina con ozonoterapia.

Al Posgrado de Periodoncia e Implantología Oral de la UANL, con especial atención a la Dra. Gloria Martínez Sandoval por facilitarme la oportunidad de realizar el proyecto en conjunto con mis estudios y labores dentro del posgrado. A la Dra. Adriana Herrera Rodríguez que además de ser una fuente de apoyo y soporte aportó más que solo conocimientos científicos durante mi investigación.

Agradezco a Dios por poner en mi camino cada persona que contribuyó en el proyecto, para enriquecer y colaborar con conocimientos, tiempo, creatividad, entre otros en el proceso de esta investigación. Cada aportación que me fue otorgada iluminó mi camino para seguir adelante en mi proyecto profesional y de vida.

Con especial atención al Dr. Hector Arizpe, ya que sin su confianza y su aportación no habría podido completar el proyecto.

A mi familia, que con su incondicional amor propiciaron que este camino de preparación, fuera lo más placentero posible.

El esfuerzo y el trabajo que ha sido impreso en el presente proyecto, ha sido impulsado por mis maestros y colegas de la UANL, con la finalidad de ampliar mis conocimientos. Les dedico mi labor de investigación a todos ellos, por ser los responsables de que haya despertado en mí un interés en la investigación, como parte de mi formación como futura periodoncista.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	5
NOMENCLATURA	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. HIPÓTESIS.....	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo General.....	13
3.2 Objetivos específicos	13
4. ANTECEDENTES	14
4.1 Cicatrización	14
4.2 Inflamación	15
4.3 Ozono.....	15
5. DISEÑO.....	18
5.1 Número de Muestras a Estudiar	18
5.2 Conocimiento de los Investigadores en los Factores del Estudio:	18
5.3 Participación del Investigador:.....	18
5.4 Tiempo en que Suceden los Eventos:.....	18
5.5 Relación que Guardan entre sí los Datos:	19
5.6 Pruebas de Diagnóstico para medir Sensibilidad y Especificidad:.....	19
5.7 Estudios para medir la Asociación:	20
6. MÉTODOS.....	21
6.1 Universo del estudio:	21
6.2 Forma de asignación de casos a los grupos de estudio:	21
6.3 Características del grupo control y del grupo experimental:	21
6.4 Diseño estadístico.....	22
6.4.1 Características del grupo experimental.....	23
6.4.2 Características del grupo control	23
6.5 Criterios de Selección.....	23
6.5.1 Criterios de Inclusión:	23
6.5.2 Criterios de Exclusión:.....	24
6.5.3 Criterios de Eliminación:	24
7. RESULTADOS	25
8. DISCUSIÓN	32
9. CONCLUSIONES	34
10. INFORMACIÓN PERSONAL	35

NOMENCLATURA

µg	microgramo
µL	microlitro
mm	milímetro
mL	mililitro
CHX	clorhexidina
O ₃	ozono
cm	centímetro
HyE	Hematoxicilina y Eosina
TM	Tricrómico de Mason
IL1-β	Interleucina 1 beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
CCL-3	MIP-1 alfa

RESUMEN

Introducción: La ozonoterapia tiene efectos antimicrobianos y bacteriostáticos por lo que se ha propuesto su uso dentro de la cirugía médica y odontológica.

Objetivo: Evaluar la eficacia del ozono en la cicatrización de heridas, analizando la histopatología y la presencia de células productoras de citocinas proinflamatorias y quimiocinas IL-1beta, TNF-alfa, RANTES y CCL-3.

Material y Métodos: Se utilizaron ratones BALB/c, se realizaron heridas de 10mm de longitud. Se suturaron las heridas y se inició inmediatamente la ozonoterapia por ionoforesis a 6µg/ml por 1 minuto, se repitió la dosis a las 24 y 48 horas. Se tomaron fotografías para observar el cierre de la herida clínica al día 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 antes de ser sacrificados. Se tomaron muestras del tejido, estas se fijaron en formaldehído al 4% y se incluyeron en parafina. Se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (HyE), Tricómico de Masson (TM) e inmunocitoquímica con anticuerpos dirigidos a IL-1beta, TNF-alfa, RANTES y CCL-3. La inflamación fue valorada como leve, moderada y severa. Se realizó un análisis morfométrico de células y fibras del tejido conectivo.

Resultados: Al análisis clínico macroscópico, las heridas tratadas con ozonoterapia obtuvieron un cierre de la herida más rápido que las control. Al microscopio, en los cortes teñidos con HyE se encontró inflamación moderada en el tejido control, en los tratados con ozono solo se encontró inflamación leve. En cortes teñidos con TM tratados con ozono, se observó una disposición más ordenada de las fibras colágenas en la dermis reticular, con menor cantidad de tejido inflamatorio ($p<0.05$). Se obtuvieron mayor cantidad de células productoras de IL1-beta, TNF-alfa, RANTES y CCL-3 en los tejidos sin ozono en comparación con los tratados con ozono.

Conclusiones: El ozono provee efectos positivos sobre el proceso fisiológico de la cicatrización, acelerando la recuperación tegumentaria clínica y disminuye la presencia de citocinas proinflamatorias y quimiocinas.

Palabras Claves: ozonoterapia, cicatrización, citocinas proinflamatorias, quimiocinas.

ABSTRACT

Introduction: Ozonotherapy has an antimicrobial and bacteriostatic effect, which is the possible cause that now is proposed on medicine and dentistry.

Objective: To evaluate the efficacy of ozone therapy on the wound healing process, by analyzing the histopathology and the presence of proinflammatory cytokines and chemokines.

Material and Methods: In male BALB/c mice of 12 weeks, 10mm wounds were performed and sutured. The animals were randomly separated into two groups, experimental and control. The experimental group received immediately after suturing, a 1 minute ozone therapy at a concentration of 6µg/ml, using a photodynamic device; followed by consecutive applications after 24 and 48 hours. Clinical pictures were taken at day 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 8 before being sacrificed. Tissue fixed in a 4% formaldehyde solution was included in paraffin. The sections were stained in hematoxylin and eosin (HE), Masson's trichrome (MT), and immunocytochemistry with antibodies directed to IL-1beta, TNF-alpha, RANTES and CCL-3.

Results: A morphometric analysis of cells and connective tissue fibers was performed. Moderate inflammatory infiltrate was identified in the sections stained by HE representing the control group. In contrast, only mild inflammatory infiltrate were found in the experimental group treated with ozone therapy. In the sections stained with TM, the ozone treated group showed an organized disposition of the collagen fibers at the reticular dermis, with a lower quantity of inflammatory tissue and ground substance ($p<0.05$). A higher amount of IL1-beta, TNF-alpha, RANTES and CCL-3 producing cells were found in control tissue in comparison with tissue treated with ozone.

Conclusion: Ozone provides positive effects on the physiological process of wound healing, accelerating the clinical tegumentary recovery and decreasing the presence of proinflammatory cytokines and chemokines.

Key Words: ozone therapy, wound healing, proinflammatory cytokines, chemokines.

1. INTRODUCCIÓN

Los efectos biológicos del ozono han sido utilizados en medicina general desde hace muchos años para eliminar bacterias, hongos, inactivar virus y controlar hemorragias (Nogales et al., 2008). El ozono fue descubierto en 1840 por el químico Christian Frederick Schonbein en la Universidad de Basil en Suiza, el ozono fue utilizado por primera vez en medicina en 1870 por Landler. Sin embargo, fue hasta 1932 que el ozono fue estudiado en la comunidad científica. El Dr. E. A. Fisch utilizó el agua ozonificada como desinfectante y después de analizar los resultados obtenidos, lo aplicó dentro de la cirugía general. El grado médico de ozono es una mezcla de oxígeno puro 0.05% a 5% de O_3 y 95% a 99.95% de O_2 . Debido a la inestabilidad de la molécula de O_3 , el grado de ozono médico debe ser preparado inmediatamente antes de su uso. En menos de una hora después de la preparación de la mezcla, solo la mitad es transformada en oxígeno.

El ozono puede ser aplicado de cuatro formas distintas. La primera forma y la más comunmente utilizada es el gas (Pichavant et al., 2008) , pero sus alto índice de toxicidad y complicaciones por aspiración incontrolada, lo posicionan como una alternativa de manejo con alto conocimiento previo (Bocci, 2006). La segunda aplicado sobre aceite extraído de semillas de sesamo y en aceite de oliva (Gupta and Mansi, 2012). La tercera es como agua o líquido ozonificado, utilizado como desinfectante y colutorio para disminuir el índice bacteriano sobre heridas infectadas y laceraciones de tejidos blandos (Kawara et al., 2014). Hoy en día la cuarta forma es aplicada dentro de la terapia fotodinámica como ionoforesis, que al contacto con el tejido vivo la luz transforma el oxígeno en ozono aportando el tercer átomo para formar la molécula; con una gran facilidad de manejo en dosificación.

A pesar de que su aplicación dentro de la medicina se origina desde finales del siglo XIX, los estudios sobre su uso en la odontología han sido reportados hasta pocos años atrás (Castillo et al., 2008). La ozonoterapia es un tema que en la actualidad no ha sido bien descrito, pero sí existen reportes de su aplicación (Nogales et al., 2008; Stubinger et al., 2006) que avalan su eficacia y lo convierten en un posible coadyuvante en las terapias quirúrgicas, ya que sus efectos sobre los tejidos blandos y duros de la cavidad oral han sido favorables.

2. HIPÓTESIS

El ozono producirá cambios positivos en la cicatrización de heridas provocadas en ratones. Facilitará la cicatrización que se llevará a cabo, propiciando una buena vascularización en los tejidos que permita el flujo sanguíneo adecuado a través de la herida. El ozono proveerá el oxígeno necesario para promover la formación rápida de colágeno que ayudan a la recuperación epitelial en una etapa más temprana. Las heridas al estar en contacto con el ozono aplicado consecutivamente provocará una disminución en la presencia de células productoras de citocinas proinflamatorias y quimiocinas IL-1 β , TNF α , RANTES y CCL-3, acelerando los procesos fisiológicos de la cicatrización.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Evaluar los efectos de la ozonoterapia en heridas causadas en ratones y la relación que existe con la pronta cicatrización y disminución de citocinas proinflamatorias y quimiocinas IL-1 β , TNF α , RANTES y CCL-3.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar el proceso de cicatrización fisiológico con el proceso de cicatrización bajo la terapia del ozono por ionoforesis mediante un análisis de recuperación epitelial.
- Cuantificar si existe una disminución en la cantidad de citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF α , y quimiocinas RANTES y CCL-3.

4. ANTECEDENTES

4.1 Cicatrización

La cicatrización es un proceso biológico y fisiológico complejo comúnmente dividido en diferentes fases: inflamación, re-epitelización, formación de tejido de granulación, formación de la matriz y remodelación de tejido. El uso de agentes antimicrobianos tales como el ozono, pueden alterar la naturaleza y calidad del infiltrado inflamatorio que comúnmente se produce tras la realización de una herida y del tejido de granulación (Kozlovsky et al., 2007). La cicatrización se lleva a cabo tras una lesión, y la reparación temprana sin complicaciones de la misma en ocasiones es difícil de conseguir, ya que va relacionada de manera dependiente con el ambiente, las bacterias que pueden rodear la herida, y el estado sistémico de recuperación de los tejidos.

En la mucosa oral, este proceso es coordinado por diversos tipos celulares incluyendo fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y plaquetas. La migración, infiltración, proliferación y diferenciación de éstas células culminan con la respuesta inflamatoria de las mismas y por consiguiente del tejido, y es ahora cuando se lleva a cabo la formación de nuevo tejido para finalmente obtener el cierre de la herida (Patel et al., 2012). El ambiente en el que se lleve a cabo la cicatrización de la herida, influirá en el riesgo a contaminación y ocasionará el retraso en la cicatrización. Existen factores bacterianos que pueden afectar y comprometer el tiempo de regeneración de los tejidos, infectando la herida provocando que el proceso inflamatorio se agudice y que las células requieran mayor tiempo para desencadenar el proceso de lisis y de desinflamación del área (Rusak and Rybak, 2013).

La infección de heridas causada por patógenos perturba el proceso de cicatrización rutinaria mediante la inflamación prolongada del sitio afectado.

4.2 Inflamación

La inflamación es una respuesta inmune normal del organismo tras una irritación (Muluye et al., 2014). Sin embargo, cuando existe alguna afección disfuncional del proceso regular de recuperación tras la lesión, el mismo organismo reaccionará de forma adversa prolongando los tiempos de cicatrización (Morris et al., 2014). Los efectos proinflamatorios inducen la liberación de histamina generando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el sitio de la inflamación (Rocha et al., 2014). La generación local de citocinas proinflamatorias, tales como la IL-1beta y TNF-alfa producen un aumento en las molestias postoperatorias y retardan la regeneración de tejidos y la recuperación epitelial de la herida (Amanvermez et al., 2013).

4.3 Ozono

El ozono como indica su fórmula molecular O_3 , consta de 3 átomos de oxígeno y puede ser aplicado en forma de aceite extraído de una planta, en solución acuosa como líquidos ozonificados, y en forma gaseosa infiltrándose primero en el área problema, después ozonificando la sangre y finalmente infiltrándolo vía rectal. La ozonoterapia ha sido útil para diversos padecimientos crónicos en pacientes que han intentado la medicina

alópata, pero buscan una alternativa que pueda resolver mejor sus molestias sin ocasionar efectos secundarios.

El ozono dentro de la medicina ortodoxa, es relevante por su efecto antimicrobiano (Burke, 2012), su forma tópica ha producido efectos positivos en la cicatrización (Nogales et al., 2008), actuando también como antibiótico (Huang et al., 2010) y quimioterapéutico para combatir patógenos resistentes.

Huang HJ en el 2010 estudió el efecto del ozono sobre heridas infectadas por diversas razones dentro de la cavidad oral, utilizando agua ozonificada (Huang et al., 2010). El ozono en altas concentraciones en su forma acuosa (20 microgramos/mL) al igual que la clorhexidina, tiene la cualidad de casi matar a todas las células del *biofilm* (Hayakumo et al., 2013). Por lo que se concluyó que el agua ozonificada otorga mejores efectos para promover la cicatrización de las heridas infectadas.

La evidencia clínica en la literatura del ozono aplicada en odontología, ha tenido resultados que potencializan los procesos de cicatrización que actúan sobre los tratamientos tanto preventivos como en los quirúrgicos. La ozonoterapia es un término que actualmente en odontología no ha sido bien descrito aún, pero sí existen reportes de su aplicación (Nogales et al., 2008; Stubinger et al., 2006) que avalan su eficacia y lo convierten en un posible coadyuvante en las terapias periodontales quirúrgicas, ya que sus efectos sobre los tejidos blandos y duros de la cavidad oral han sido sorprendentes.

Existen diversos mecanismos que aceleran o favorecen la cicatrización tisular, tales como el plasma rico en plaquetas (Yen et al., 2007), y el plasma rico en factores de crecimiento que permite la colocación de proteínas en el sitio de la lesión para ayudar en la

regeneración tisular (Anitua et al., 2013). Se ha estudiado también que las células del estroma del cordón umbilical del humano promueven la cicatrización de forma parácrina, junto con la habilidad de diferenciarse entre sí, dando como resultado beneficios terapéuticos en el tratamiento de las heridas (Shohara et al., 2012). Pero ninguna de éstas antes mencionadas cuenta con la disponibilidad para acelerar los procesos de cicatrización, actuar como bactericida y tener la capacidad de disminuir el dolor (Magalhaes et al., 2012), tal como lo hace el ozono.

La exposición de mecanismos moleculares como el ozono sobre los tejidos blandos gingivales (Saini, 2011) provee beneficios a largo plazo en la odontología. Es por eso que se considera su aplicación sobre injertos gingivales, con la intención de que pueda otorgar un aumento en el porcentaje de éxito de dicho tratamiento. Su aplicación de forma tópica sobre los procedimientos quirúrgicos periodontales, ha obtenido excelentes resultados mejorando la cicatrización, por los mecanismos bacteriostáticos que posee antes mencionados (Lang and Loe, 1972).

Punit Patel (2012), estudió el efecto terapéutico que produce la utilización del ozono en aceite tópico sobre la cicatrización de los injertos gingivales libres, y se demostró una rapidez en la cicatrización (Patel et al., 2012). Por lo que lo hace ser un coadyuvante potencial en relación a los procedimientos quirúrgicos periodontales.

5. DISEÑO

5.1 Número de Muestras a Estudiar

Según el problema propuesto y los objetivos planteados, la presente investigación es de tipo:

- Comparativo – Analítico: se determinaron y compararon las medidas de recuperación epitelial a los 2, 4, 6 y 8 días. Así como también se analizaron morfométricamente la cantidad de células positivas a citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α y quimiocinas RANTES y CCL-3.

5.2 Conocimiento de los Investigadores en los Factores del Estudio:

- Abierto
Se conocen las variables del experimento.

5.3 Participación del Investigador:

- Experimental
Se controlaron todos los eventos estudiados.

5.4 Tiempo en que Suceden los Eventos:

- Prospectivo:

Los datos obtenidos en el estudio al día 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 posteriores a la realización de las heridas en los ratones fueron registrados mediante fotografías. El análisis de recuperación epitelial fue determinado a los días 2, 4, 6 y 8 antes de el sacrificio de los animales. El estudio y análisis microscópico e inmunocitoquímico se determinó por medio de cortes histológicos del tejido cicatrizal de los mismos. Cualquier evento adverso durante la fase experimental fue registrada.

5.5 Relación que Guardan entre sí los Datos:

- Transversal

La recolección de datos se realizó en un momento determinado.

5.6 Pruebas de Diagnóstico para medir Sensibilidad y Especificidad:

- Clínico – Fotográfico

La información se evaluó mediante fotografías tomadas a la misma distancia de las heridas en los ratones a los días 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8.

- Histopatológico

Evaluación de la inflamación en los cortes histológicos, categorizados como leve, moderado y severo.

- Inmunocitoquímico

Mediante el reconocimiento y cuantificación de células positivas a citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α y quimiocinas RANTES y CCL-3.

5.7 Estudios para medir la Asociación:

- Análisis Milimétrico:

Las heridas fueron medidas así como comparadas entre los grupos control y experimental, identificando la diferencia entre grupos.

- Análisis Morfométrico:

En campos microscópicos, en base a la presencia o ausencia de citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α y quimiocinas RANTES y CCL-3.

6. MÉTODOS

6.1 Universo del estudio:

Se trataron 9 ratones de 12 semanas de edad, pesando alrededor de 25-30 gramos en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Odontología, UANL.

Tamaño de la muestra: 9 ratones, 2 ratones categorizados como controles y 7 categorizados como experimentales.

6.2 Forma de asignación de casos a los grupos de estudio:

- Aleatoria.

Se utilizaron tablas para generar números aleatorios.

6.3 Características del grupo control y del grupo experimental:

Se utilizaron los ratones de la cepa BALB-c pertenecientes a cada grupo de manera aleatoria, ambos grupos mostrando las mismas características de edad y peso. Separados y alimentados a placer, se anestesiaron a los ratones con 25µL de xilacina y 5µL de ketamina. Se realizaron heridas de 10mm de longitud en el dorso previamente rasurado de cada ratón. Se suturaron las heridas con seda negra 4-0 puntos directos 2 por incisión. El grupo experimental se sometió inmediatamente a la ozonoterapia por medio de ionoforesis con una dosis de 6µg/ml por 1 minuto, la misma dosis se repitió a las 24 y 48 horas. Se tomaron fotografías de las heridas de cada ratón para observar el cierre y la cicatrización de las heridas de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 antes de ser sacrificados. Los ratones fueron sacrificados mediante una sobredosis de los sedantes para la toma de tejido. El tejido fue

fijado en formaldehído al 4% y después incluido en parafina, posteriormente se realizaron cortes de 7µm de grosor. Las muestras fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina (HyE), Tricómico de Masson (TM) e inmunocitoquímica con anticuerpos dirigidos a IL-1beta, TNF-alfa, RANTES y CCL-3. Mediante un análisis morfométrico de células y fibras de tejido conectivo la cicatrización fue valorada. La inflamación se categorizó y evaluó como leve, moderada y severa.

6.4 Diseño estadístico

La población del estudio fue conformada por ratones de la cepa BALB-c que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión, fueron clasificados aleatoriamente en grupo experimental y grupo control.

Los datos fueron capturados en una base de datos y se realizaron tablas de frecuencia de dos variables dentro de las cuales serán consideradas las variables principales (IL-1β, TNF-α, RANTES y CCL-3) confrontados con el resto de las variables establecidas en el instrumento de observación. Para algunos procedimientos estadísticos de clasificación y manejo de base de datos se empleó el programa Microsoft Excel 2010.

El presente proyecto cuenta con un modelo estadístico de presentación de datos que consistirá en la elaboración y descripción de tablas de frecuencias para las variables cualitativas y de intervalo, así como un modelo descriptivo de medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas, además del uso de gráficos para las tablas mayormente relacionadas con el análisis de los datos, posterior a este diseño se realizó una descripción detallada de los resultados.

El modelo de análisis de datos aplicado al presente estudio consistió en una prueba t de diferencia de medias, la cual se reflejó hasta que se contaron con los datos para realizar las pruebas pertinentes. La prueba consistió en obtener el promedio y la desviación estándar de los datos de ambos grupos y confrontarlos entre sí, evidenciando si existiera diferencia, estadísticamente significativa, entre los promedios del grupo experimental y los del grupo control.

Todas las pruebas aplicadas al presente proyecto fueron realizadas considerando un nivel de confiabilidad de 95% ($1-\alpha$: 0.95).

6.4.1 Características del grupo experimental

Ratones dentro de los criterios de inclusión y de exclusión.

6.4.2 Características del grupo control

Ratones dentro de los criterios de inclusión y de exclusión.

6.5 Criterios de Selección

6.5.1 Criterios de Inclusión:

Grupo en estudio:

- Ratones BALB-c.

- Edad: 12 semanas.
- Peso: 25-30 gramos.

Grupo control:

- Ratones BALB-c.
- Edad: 12 semanas.
- Peso: 25-30 gramos.

6.5.2 Criterios de Exclusión:

Ratones con alguna alteración o enfermedad.

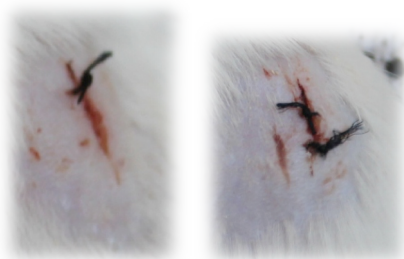
6.5.3 Criterios de Eliminación:

Se eliminaron del estudio los ratones tratados que al momento de aplicar el ozono, alguna falla relacionada con el aparato generador de ozono involucre el compromiso de la cicatrización.

7. RESULTADOS

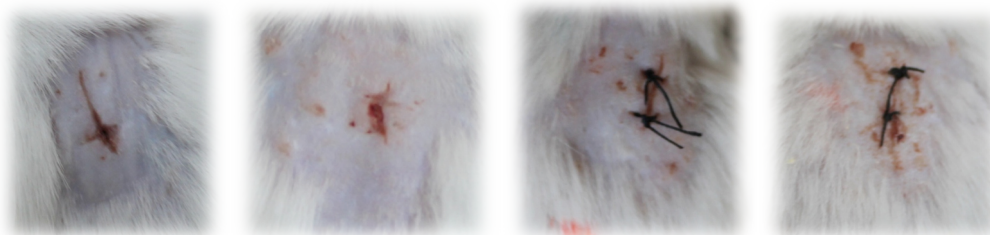
Macroscópicamente las heridas de los ratones pertenecientes al grupo experimental tratados con ozono obtuvieron un cierre de la herida más rápido y pronto que las heridas control.

Figura 1. Herida en ratones pertenecientes al grupo control.



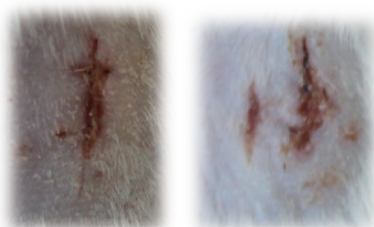
Heridas del grupo control a las 24 horas sin ozonoterapia.

Figura 2. Herida en ratones pertenecientes al grupo experimental con ozonoterapia.



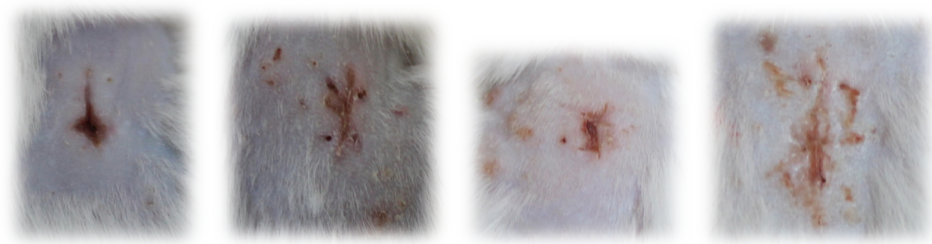
Heridas del grupo experimental a las 24 horas con ozonoterapia.

Figura 3. Herida en ratones pertenecientes al grupo control.



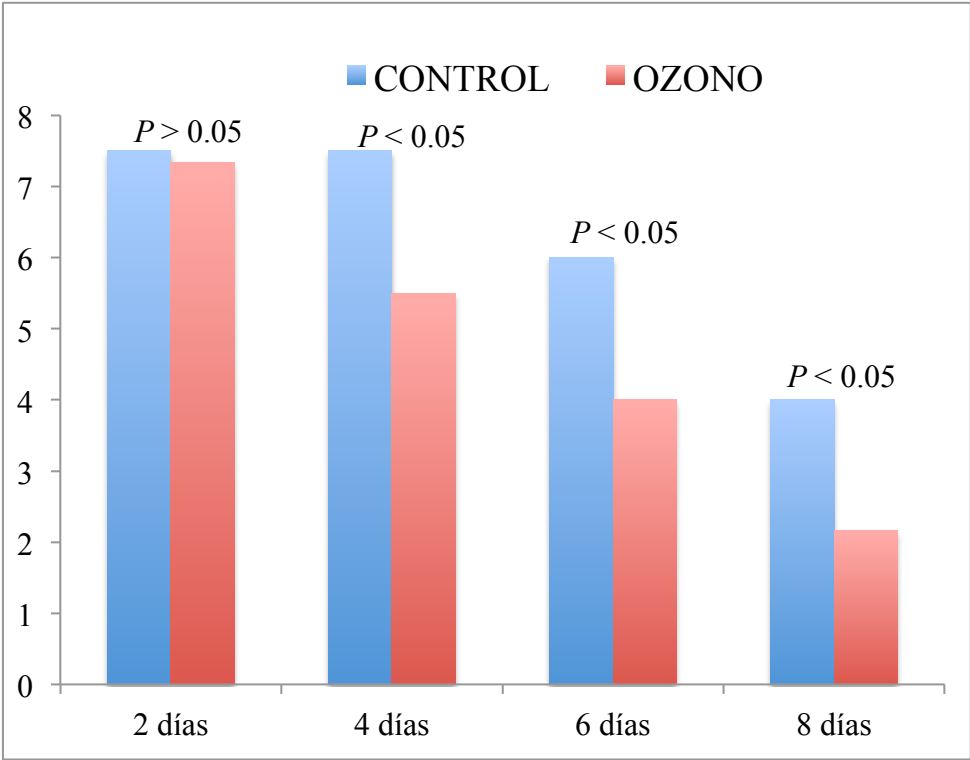
Heridas del grupo control a las 48 horas sin ozonoterapia.

Figura 4. Herida en ratones pertenecientes al grupo experimental con ozonoterapia.



Heridas del grupo experimental a las 48 horas con ozonoterapia.

Tabla 1. Cierre de heridas grupo control y experimental.

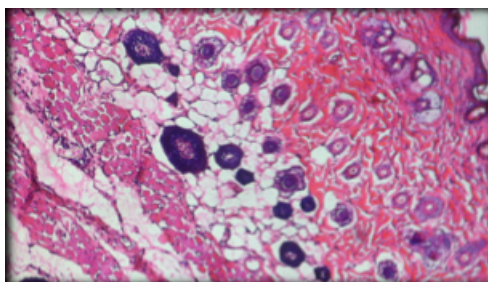


Se evaluó milimétricamente la cicatrización de las heridas realizadas en los ratones controles y experimentales para comparar el cierre epitelial a los días 2, 4, 6 y 8. En el grupo experimental fue significativamente más rápida la cicatrización en comparación con los pertenecientes al grupo control. Al día 2 después de realizadas las heridas la diferencia no fue tan marcada entre grupos, sin embargo las heridas tratadas con ozono midieron menos que las controles. A partir del día 4 las heridas con ozono cerraron más pronto midiendo menos milímetros, así consecutivamente en el día 6 y posteriormente al día 8.

Microscópicamente, en los cortes teñidos con HyE se encontró presencia de inflamación moderada en el grupo control, y en los tratados con ozonoterapia se encontró inflamación leve. En los cortes teñidos con TM del grupo experimental, generalmente se observó una disposición más organizada de las fibras de colágena en la dermis reticular, con menor cantidad tejido inflamatorio ($p < 0.05$).

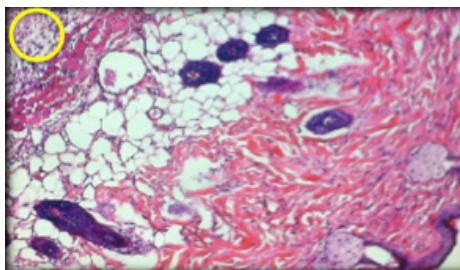
Mediante la inmunocitoquímica se obtuvo una mayor cantidad de células productoras de IL1-beta y TNF-alfa en los tejidos del grupo control en comparación con los del grupo experimental.

Figura 5. Tinción HyE grupo experimental con ozonoterapia.



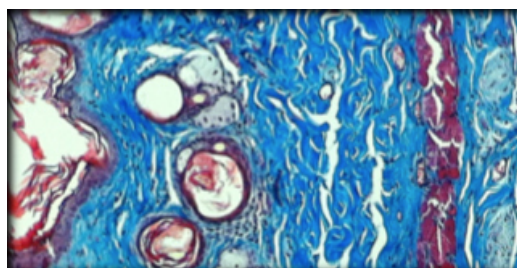
Se observa un corte de piel a los 7 días de haberseles realizado las heridas, con aplicación a las 24 y 48 horas de ozonoterapia por ionoforesis.

Figura 6. Tinción HyE grupo control sin ozonoterapia.



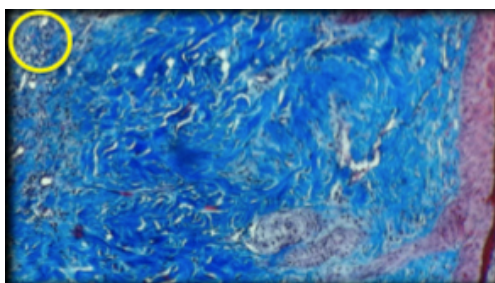
Se observa un corte de piel a los 7 días de haberseles realizado las heridas, sin aplicación de ozonoterapia. Presencia de poco tejido inflamatorio en el área circunscrita por el círculo amarillo, en comparación con el grupo experimental.

Figura 7. Tinción TM grupo experimental con ozonoterapia.



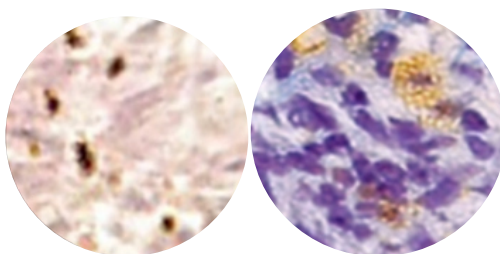
Se observa buena disposición de las fibras de colágena, con organización y cantidad adecuada de sustancia fundamental.

Figura 8. Tinción TM grupo control sin ozonoterapia.



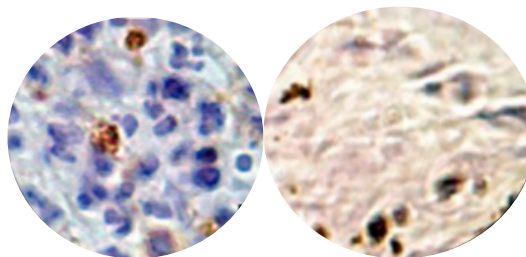
Se realizó un análisis morfométrico en campos de 400 micras cuadradas en la región donde se observa el infiltrado inflamatorio.

Figura 9. Análisis Inmunocitoquímico grupo experimental.



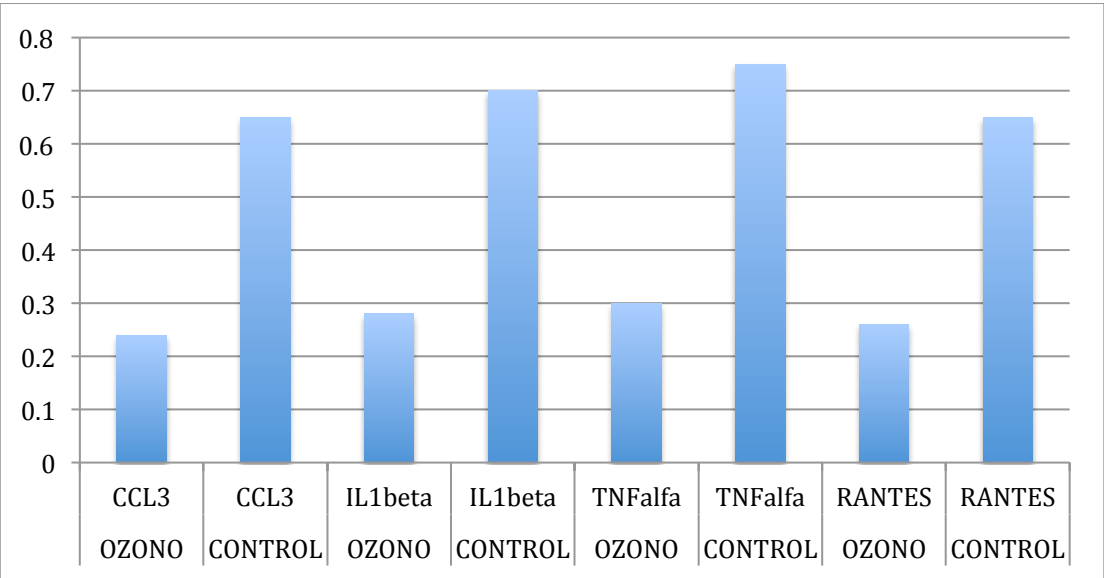
Grupo Experimental con ozonoterapia, se observa en la fotografía de la izquierda la inmunocitoquímica con TNF α y en la derecha con IL1 β .

Figura 10. Análisis Inmunocitoquímico grupo control.



Grupo Control con ozonoterapia, se observa en la fotografía de la izquierda la inmunocitoquímica con TNF α y en la derecha con IL1 β .

Tabla 2. Inmunoreactividad celular a citocinas proinflamatorias y quimiocinas IL1-beta, TNF-
alfa, RANTES, CCL-3.



La presencia de células inmunoreactivas fue morfométricamente analizada y registrada para ambos grupos control y experimental. Los casos experimentales demostraron una cantidad inferior, menor a la mitad de células encontradas en los casos controles de citocinas proinflamatorias y quimiocinas. Por lo que el proceso inflamatorio en los casos tratados con ozonoterapia fue notablemente menor, con un conteo celular disminuido de células productoras de IL1-beta, TNF-alfa, RANTES y CCL-3, que en las heridas que cerraron fisiológicamente por sí solas. RANTES y CCL-3 estuvieron menos presentes en la cicatrización de las heridas realizadas en ratones. TNF-alfa en casos controles fue la citocina

proinflamatoria mayormente encontrada. En los casos tratados con ozonoterapia la presencia entre las diversas citocinas proinflamatorias y quimiocinas no varía de manera significativa, sin embargo están poco presentes en todos los casos experimentales.

Tabla 3. Prueba T para grupo control y la presencia de citocinas proinflamatorias y quimiocinas.

	Prueba T Valores “p”
IL-1 beta vs Control	0.03781
TNF-alfa vs Control	0.00244
RANTES vs Control	0.0438
CCL-3 vs Control	0.03221

Con un 95% de confiabilidad la tabla muestra diferencias significativas entre el grupo control y las citocinas proninflamatorias y quimiocinas IL-1beta, TNF-alfa, RANTES y CCL-3.

8. DISCUSIÓN

El proceso inflamatorio que ocurre tras una agresión a los tejidos se considera como parte del sistema inmunológico de defensa. La inflamación puede ser analizada macroscópicamente o microscópicamente. En este estudio se logró obtener un análisis comparativo entre el grupo ozonificado y el grupo control. En el cual se observó una amplia diferencia en la cicatrización, ya que el grupo ozonificado mostró una recuperación epitelial mas rápida, que la del grupo control.

En comparación, en el grupo control, se observó una recuperación epitelial significativamente menor, notable mayormente al día 7 en donde los casos del grupo ozono mostraron un incremento potencial en el cierre de las heridas. Indicando que el grupo de ozono obtuvo un cierre más temprano de la herida con una formación más pronta de fibras de colágeno (Kepler et al., 2013). Esto a su vez, puede explicarse debido a que el riego sanguíneo se mejora mediante el uso de la ozonoterapia, ya que promueve una angiogenesis acelerada (Valacchi et al., 2011).

Otros autores han mostrado que el ozono provee el oxígeno necesario para promover la formación rápida de colágeno que ayudan a la cicatrización de heridas. Logrando facilitar los procesos fisiológicos de cicatrización disminuyendo la inflamación, contribuyendo a la difusión de nutrientes y productos metabólicos responsables de la adecuada vascularización (Sullivan H.C., Atkins J.H., 1968).

La IL-1beta se libera durante el proceso inflamatorio causado por una lesión tisular. Los estudios de inmunocitoquímica reflejan las células positivas a la citocina en específico y estudios comprueban su relación con el dolor o molestias relacionadas con la lesión.

Actualmente el ozono y sus productos han sido estudiados por su influencia sobre los factores de crecimiento, citocinas, y reguladores del ciclo celular en sistemas biológicos. Bocci y cols realizaron una serie de estudios (Bocci V., et al, 1994) y mostraron que el contacto del ozono con la sangre humana permitía un aumento en la liberación de TGF-beta1; INF-alfa,-beta y -gamma; interleucinas-1, -2, -6 y -8, y TNF-alfa, que son esenciales en el proceso de cicatrización en el humano. El ozono sobre los tejidos blandos orales produce cambios positivos en la cicatrización, con potencial para aminorar las molestias postoperatorias (Kazancioglu et al., 2014).

La aplicación de la ozonoterapia en enfermedades crónico degenerativas tales como la diabetes tipo 2, demuestran el potencial oxidativo homeostático que aporta para la reducción de dicha enfermedad caracterizada por una disfunción en el metabolismo y un estrés oxidativo crónico (Bocci et al., 2014).

Los efectos reportados con la utilización del ozono han sido positivos, pero se deberá tener presente las concentraciones adecuadas para su uso en específico. Sus cualidades bactericidas (Gulmen et al., 2013), virucidas y fungicidas, son relevantes dentro de los cuidados postoperatorios que deberán tomar en cuenta los pacientes para su correcto control de placa dentobacteriana. Es de suma importancia tomar en cuenta las concentraciones en las que el ozono sea aplicada ya que otorga excelentes beneficios. Sin embargo, si la concentración es muy elevada, puede llegar a ocasionar complicaciones respiratorias y cardiovasculares (Deng et al., 2013)

9. CONCLUSIONES

El presente estudio fue realizado para evaluar los efectos terapéuticos del ozono sobre la cicatrización de heridas realizada en ratones. Se observó una recuperación tegumentaria clínica de las heridas más rápida en los tejidos tratados con ozono en comparación con los controles. Mediante el uso de la ozonoterapia, el cierre tegumentario de las heridas realizadas fueron cerradas en un menor tiempo que las heridas que no fueron tratadas. A su vez, en estudios inmunocitoquímicos se observó una disminución en la cantidad de células productoras de citocinas proinflamatorias y quimiocinas IL1-beta, TNF-alfa, RANTES y CCL-3.

El efecto del ozono estimula el proceso de cicatrización, promoviendo la vascularización acelerada sobre las heridas. Su capacidad antimicrobiana promueve la fácil re-epitelización. El ozono es capaz de inducir la queratinización de las heridas más rápido que el proceso fisiológico de cicatrización.

10. INFORMACIÓN PERSONAL

Lucía Isabel Gómez Butzmann.

Paseo de los Olivos 3609 Colonia del Paseo Residencial, Mty., N.L., México
Facultad de Odontología, UANL. Posgrado de Periodoncia e Implantología Oral

81-83-57-88-22

lucy.butzmann@gmail.com

LITERATURA CITADA

- Amanvermez, R., M. Gunay, A. Piskin, G. Keles, and L. Tomak, 2013, TNF-alpha, IL-1beta, and oxidative stress during fracture healing with or without ankaferd: Bratisl Lek Listy, v. 114, p. 621-4.
- Anitua, E., R. Tejero, M. M. Zalduendo, and G. Orive, 2013, Plasma rich in growth factors promotes bone tissue regeneration by stimulating proliferation, migration, and autocrine secretion in primary human osteoblasts: J Periodontol, v. 84, p. 1180-90.
- Bocci, V., 2006, Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma: Toxicol Appl Pharmacol, v. 216, p. 493-504.
- Bocci, V., I. Zanardi, M. S. Huijberts, and V. Travagli, 2014, An integrated medical treatment for type-2 diabetes: Diabetes Metab Syndr, v. 8, p. 57-61.
- Burke, F. J., 2012, Ozone and caries: a review of the literature: Dent Update, v. 39, p. 271-2, 275-8.
- Castillo, A., P. Galindo-Moreno, G. Avila, M. Valderrama, J. Liebana, and P. Baca, 2008, In vitro reduction of mutans streptococci by means of ozone gas application: Quintessence Int, v. 39, p. 827-31.
- Deng, Z., Z. C. Gao, H. Q. Ge, L. R. Zhang, J. J. Zhou, Z. P. Zhu, D. Y. Wu, S. Y. Sun, L. Chen, and X. P. Pu, 2013, Treatment responses of procaterol and CD38 inhibitors in an ozone-induced airway hyperresponsiveness mice model: Biol Pharm Bull, v. 36, p. 1348-55.
- Gulmen, S., T. Kurtoglu, I. Meteoglu, S. Kaya, and H. Okutan, 2013, Ozone therapy as an adjunct to vancomycin enhances bacterial elimination in methicillin resistant Staphylococcus aureus mediastinitis: J Surg Res, v. 185, p. 64-9.
- Gupta, G., and B. Mansi, 2012, Ozone therapy in periodontics: J Med Life, v. 5, p. 59-67.
- Hayakumo, S., S. Arakawa, Y. Mano, and Y. Izumi, 2013, Clinical and microbiological effects of ozone nano-bubble water irrigation as an adjunct to mechanical subgingival debridement in periodontitis patients in a randomized controlled trial: Clin Oral Investig, v. 17, p. 379-88.

- Huang, H. J., B. Yu, Q. R. Lin, B. W. Wang, and H. Q. Chen, 2010, [Effect of ozone water on the inflammation and repair in infected wounds]: *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, v. 30, p. 515-8.
- Kawara, F., J. Inoue, M. Takenaka, N. Hoshi, A. Masuda, S. Nishiumi, H. Kutsumi, T. Azuma, and T. Ohdaira, 2014, The Influences of Pepsin Concentrations and pH Levels on the Disinfective Activity of Ozone Nanobubble Water against *Helicobacter pylori*: *Digestion*, v. 90, p. 10-17.
- Kazancioglu, H. O., E. Kurklu, and S. Ezirganli, 2014, Effects of ozone therapy on pain, swelling, and trismus following third molar surgery: *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 43, p. 644-8.
- Kepler, C. K., D. Z. Markova, F. Dibra, S. Yadla, A. R. Vaccaro, M. V. Risbud, T. J. Albert, and D. G. Anderson, 2013, Expression and relationship of proinflammatory chemokine RANTES/CCL5 and cytokine IL-1beta in painful human intervertebral discs: *Spine (Phila Pa 1976)*, v. 38, p. 873-80.
- Kozlovsky, A., Z. Artzi, A. Hirshberg, C. Israeli-Tobias, and L. Reich, 2007, Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing: a clinical and histomorphometric study in rats: *J Clin Periodontol*, v. 34, p. 164-71.
- Lang, N. P., and H. Loe, 1972, The relationship between the width of keratinized gingiva and gingival health: *J Periodontol*, v. 43, p. 623-7.
- Magalhaes, F. N., L. Dotta, A. Sasse, M. J. Teixeira, and E. T. Fonoff, 2012, Ozone therapy as a treatment for low back pain secondary to herniated disc: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials: *Pain Physician*, v. 15, p. E115-29.
- Morris, M. W., Jr., M. Allukian, 3rd, B. J. Herdrich, R. C. Caskey, C. Zgheib, J. Xu, W. Dorsett-Martin, M. E. Mitchell, and K. W. Liechty, 2014, Modulation of the inflammatory response by increasing fetal wound size or interleukin-10 overexpression determines wound phenotype and scar formation: *Wound Repair Regen*, v. 22, p. 406-14.
- Muluye, R. A., Y. Bian, and P. N. Alemu, 2014, Anti-inflammatory and Antimicrobial Effects of Heat-Clearing Chinese Herbs: A Current Review, *J Tradit Complement Med*, v. 4, p. 93-98.
- Nogales, C. G., P. H. Ferrari, E. O. Kantorovich, and J. L. Lage-Marques, 2008, Ozone therapy in medicine and dentistry: *J Contemp Dent Pract*, v. 9, p. 75-84.

- Patel, P. V., S. Kumar, G. D. Vidya, A. Patel, J. C. Holmes, and V. Kumar, 2012, Cytological assessment of healing palatal donor site wounds and grafted gingival wounds after application of ozonated oil: an eighteen-month randomized controlled clinical trial: *Acta Cytol*, v. 56, p. 277-84.
- Pichavant, M., S. Goya, E. H. Meyer, R. A. Johnston, H. Y. Kim, P. Matangkasombut, M. Zhu, Y. Iwakura, P. B. Savage, R. H. DeKruyff, S. A. Shore, and D. T. Umetsu, 2008, Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17: *J Exp Med*, v. 205, p. 385-93.
- Rocha, S. M., J. Pires, M. Esteves, B. Graca, and L. Bernardino, 2014, Histamine: a new immunomodulatory player in the neuron-glia crosstalk: *Front Cell Neurosci*, v. 8, p. 120.
- Rusak, A., and Z. Rybak, 2013, [New directions of research related to chronic wound healing]: *Polim Med*, v. 43, p. 199-204.
- Saini, R., 2011, Ozone therapy in dentistry: A strategic review: *J Nat Sci Biol Med*, v. 2, p. 151-3.
- Shohara, R., A. Yamamoto, S. Takikawa, A. Iwase, H. Hibi, F. Kikkawa, and M. Ueda, 2012, Mesenchymal stromal cells of human umbilical cord Wharton's jelly accelerate wound healing by paracrine mechanisms: *Cytotherapy*, v. 14, p. 1171-81.
- Stubinger, S., R. Sader, and A. Filippi, 2006, The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review: *Quintessence Int*, v. 37, p. 353-9.
- Valacchi, G., Y. Lim, G. Belmonte, C. Miracco, I. Zanardi, V. Bocci, and V. Travagli, 2011, Ozonated sesame oil enhances cutaneous wound healing in SKH1 mice: *Wound Repair Regen*, v. 19, p. 107-15.
- Yen, C. A., T. J. Griffin, W. S. Cheung, and J. Chen, 2007, Effects of platelet concentrate on palatal wound healing after connective tissue graft harvesting: *J Periodontol*, v. 78, p. 601-10.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Lucía Isabel Gómez Butzmann

Candidato para el Grado de
Maestro en Ciencias Odontológicas en el Área de Periodoncia con Implantología Oral

Tesis: EL OZONO ACELERA LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS Y DISMINUYE LA PRODUCCIÓN DE LAS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS Y QUIMOCINAS IL-1 β , TNF- α , RANTES Y CCL-3.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 9 de Febrero de 1989, hija de Manuel Gómez Garza y Sonia Butzmann Leal.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista en 2011.

Experiencia Profesional: Maestro de Idioma Inglés de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2006.